

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005 年 9 月 15 日 (15.09.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/085843 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 33/50, 33/82, 33/15 (74) 代理人: 庄司 隆, 外(SHOJI, Takashi et al.); 〒1010032 東京都千代田区岩本町 3 丁目 2 番 1 0 号 S N 岩本町ビル 6 階 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/003651
- (22) 国際出願日: 2005 年 3 月 3 日 (03.03.2005) (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2004-059834 2004 年 3 月 3 日 (03.03.2004) JP  
特願 2004-309702  
2004 年 10 月 25 日 (25.10.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社三菱化学ビーシーエル (MITSUBISHI KAGAKU BIO-CLINICAL LABORATORIES, INC.) [JP/JP]; 〒1748555 東京都板橋区志村 3 丁目 3 0 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 関根 恭一 (SEKINE, Kyouichi) [JP/JP]; 〒1748555 東京都板橋区志村 3 丁目 3 0 番 1 号 株式会社三菱化学ビーシーエル内 Tokyo (JP). 植竹 達雄 (UETAKE, Tatsuo) [JP/JP]; 〒1748555 東京都板橋区志村 3 丁目 3 0 番 1 号 株式会社三菱化学ビーシーエル内 Tokyo (JP).
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF IN VIVO INSPECTION OF FAT SOLUBLE VITAMIN AND/OR FAT SOLUBLE FOOD FACTOR THROUGH SALIVA ANALYSIS

(54) 発明の名称: 唾液分析による脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの検査方法

(57) Abstract: A method of measuring the in vivo migration of fat soluble vitamin and/or fat soluble food factor in the ingestion of a medicine or health supplement can be provided by using saliva as an analyte, by collecting saliva through contact with a given amount of saliva for adsorption on a saliva collection tool and by selecting a solvent for efficient extraction of a measuring target component from the saliva collection tool. Accordingly, there is provided a method of measuring the in vivo migration in the ingestion of a medicine or health supplement, characterized in that any fat soluble vitamin and/or fat soluble food factor is measured with the use of saliva as an analyte. There are further provided relevant saliva collection tool properties and extraction method from the saliva collection tool.

(57) 要約: 薬剤もしくは健康補助食品の摂取における脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内移行の測定方法のためには、唾液を検体として利用すること、唾液採取具に吸着するため一定量の唾液と接触させて採取すること、および唾液採取具から測定目的成分を効率的に抽出するための溶媒を選択することにより解決出来ることを見出し本発明を完成した。つまり、検体として唾液を用いて脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを測定することを特徴とする薬剤もしくは健康補助食品の摂取における生体内移行の検査方法、唾液採取具の性状および唾液採取具からの抽出方法を提供した。

WO 2005/085843 A1

## 明 細 書

### 唾液分析による脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの検査方法

#### 技術分野

[0001] この発明は、唾液分析による脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの検査方法に関する。

#### 背景技術

[0002] ダイエタリー・サプリメント(Dietary Supplement)は、「健康補助食品」とか「栄養補助食品」と訳され、主に、ビタミンやミネラル、アミノ酸など、日ごろ不足がちな栄養成分を補助する目的で摂取される(以下、「サプリメント」、「健康補助食品」または「栄養補助食品」と称することがある)。米国にはサプリメントについての法律があり、サプリメントを食品とも医薬品とも異なる新しいジャンルとして位置づけ、病気の発症リスクを下げる働きなどについての健康強調表示(Health Claim)を許可し、使用されている。

通常、生体投与された物質の生体内移行の分析は、血中内含有量あるいは尿内含有量などの分析によっておこなわれるが、医療機関等の特定の施設による検体採取が必須であり、栄養補助食品等に含まれる栄養成分の生体内移行の分析を被験者の都合に合わせて実施することは困難であった。

また、唾液も検体の一つになりうるが、健康補助食品の摂取における、健康補助食品に含まれる栄養成分の生体内移行の分析方法の検体としては不適であった。これは、検体採取の方法が確立しておらず、反復性ある数値の取得が困難なことも理由の一つであった。

健康補助食品に含まれる栄養成分の一つであるユビデカレノン(CoQ10)は、ミトコンドリアに常在し、電子伝達系で還元型のユビデカレノールから酸化型のユビデカレノン(CoQ10)への酸化によりADPをATPへ変換させるエネルギー生産に関わる補酵素である。その体内での主な存在部位は血中ではなく組織であり、細胞膜および細胞内器官のリン脂質二重膜に還元型としてCoQ10の約9割が存在する。CoQ10はヒトの体内でコレステロール合成経路と共通の酵素反応を経て合成できるためビタ

ミンではないが、スタチン系薬剤投与患者では合成が阻害されると言われている(Proc Natl Acad Sci. USA、1990 Nov;87: 8931-4、Lovastatin decreases coenzyme Q levels in humans、Folkers K、Langsjoen P、Willis R. Richardson P、Xia LJ、Ye CQ、Tamagawa H. )。脂溶性の高いスタチン系薬剤ほどこの合成阻害の程度が強いと言われ、CoQ10の摂取がこれによる副作用回避に有用と考えられておりすでに米国では併用投与による治験が行われている。

健康補助食品に含まれる栄養成分の一つであるトコフェロール(ビタミンE)は、脂質のラジカルによる酸化防御物質の主役であり、トコフェロールラジカル同士の衝突によりラジカルは消去される。存在量の多いトコフェロールではラジカル同士の衝突確率が低く、かえってラジカルの残存時間を長引かせてしまう。しかし体内では還元型CoQ10がトコフェロールラジカルのラジカル消去に強く関係すると考えられている。

一方、先進国では動脈硬化に起因すると考えられる心筋梗塞や脳梗塞による死亡率上昇と、生活習慣に起因すると考えられる糖尿病患者が増加しており、国内では糖尿病が新たな血液透析患者となる病因の第一位となっている。

これらいわゆる生活習慣病では、食生活の影響を強く受け、体内酸化ストレスの増加が発症に強くかかわっていると考えられており、栄養補助食品として抗酸化ストレス物質の積極的摂取が推奨されている。しかし、いわゆる非病者では病院で治療をうけるほどではないため、医師による健康管理を受ける機会を逃し、病態を進展させてから受診する悪循環が、患者増加の一因となっていると考えられる。

これまで唾液および唾液分泌にかかわる唾液分泌腺におけるトコフェロール等の脂溶性ビタミンあるいはCoQ10やリコペン等の脂溶性フードファクターの濃度および含量に関する報告は無かった。これは、人体内で合成不可能なビタミンおよび食事により摂取可能ないわゆるサプリメントの唾液中の濃度測定値は、口腔内に残留する飲食物の量および種類の影響とともに、存在する多様な細菌や真菌由来物の影響、さらには歯表面のプラーク菌叢の影響も受けると容易に想定されるためと考えられる。

なお、脂溶性の一つのビタミンAのプロビタミンであるβ-カロテンについては、血清と全唾液中濃度の間に正相関を示すことが知られていたが(例えば、非特許文献1、2参照)、非特許文献1の報告者らの目的は、「摂取したβ-カロテンが唾液腺でのグ

リコプロテインやリゾチーム等の抗細菌タンパク質の生産分泌を増強し、口腔衛生維持に役立つとの想定を確認検証すること」であり、 $\beta$ -カロテンの生体移行の程度の判定ではない。非特許文献1の報告者は、耳下腺唾液中の $\beta$ -カロテンを検出されなかったと報告している。したがって、唾液は、耳下腺唾液であっても $\beta$ -カロテンを検出することが可能であり、脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを分析して、これらの検査に適した生体試料であることを新たに提示する意義は大きい。さらに、唾液中の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを分析して、これらを検査する方法を提供することは大きな意義がある。

非特許文献1: Int. J. Vitam. Nutr. Res. 1988;58(2): 171-7 Saliva concentrations of some selected proteins and glycoprotein markers in man after supplementary intake of beta-carotene. Lumikari M. Johansson I.、Ericson T.、Virtamo J.

非特許文献2: Nutr. Cancer 1988; 11(4): 233-41 Effects of excess vitamin A and canthaxanthin On salivary gland tumors. Alam BS、Alam SQ、Weir JC Jr.

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

- [0003] 本発明の課題は、健康補助食品、薬剤または食物(以下、「健康補助食品等」と称することがある)の摂取における、健康補助食品等に含まれる栄養成分である脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内移行を検査する簡易な手段を提供することである。

### 課題を解決するための手段

- [0004] 上記課題を解決するために本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、健康補助食品等の摂取における健康補助食品等に含まれる栄養成分である脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内移行を検査するために、唾液を検体として利用出来ることを見出した。唾液中の分析対象物の濃度レベルが血中の約1/10程度でも、確実に判定できることを見出した。特に、本発明者らは、全唾液中だけでなく、検出不能であった耳下腺唾液中に $\beta$ -カロテンだけでなくリコペン、トコフェロールおよ

びCoQ10を検出し分析可能であることを見出した。また、全唾液中CoQ10等の濃度よりも耳下腺唾液の方が血中濃度とよりよい正相関を示すことを見出し、耳下腺唾液採取方法を鋭意検討改良した。さらに本発明者らは、唾液採取に吸収体を用いると、吸収体の素材によらず唾液中の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターは吸着してしまうため、一定容量の唾液と接触するように採取具を工夫し、採取具に吸着した脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを良好に回収できる抽出溶媒を用いることにより唾液中濃度を正確に分析できることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成されたものである。

[0005] すなわち本発明は、以下からなる。

1. 唾液中の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを分析することの特徴とする、生体内の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを検査する方法。
2. 唾液中の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを分析することの特徴とする、摂取された健康補助食品、薬剤または食物に含まれる脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内移行を検査する方法。
3. 検査が、健康補助食品、薬剤もしくは食物を摂取前の被験者の唾液中の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの濃度を基準あるいは健康補助食品、薬剤もしくは食物を摂取していない対照者群の唾液中の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの濃度の平均値を基準として行なわれることを特徴とする、前項2に記載の方法。
4. 唾液中の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを指標として分析することの特徴とする、投与された治療薬剤の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内合成もしくは代謝に対する効果または作用を検査する方法。
5. 検査が、治療薬剤を投与前の被験者の唾液中の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの濃度を基準あるいは治療薬剤を投与していない対照者群の唾液中の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの濃度の平均値を基準とすることを特徴とする、前項4に記載の方法。
6. 前項2または3に記載の方法を用いる、脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードフ

ァクターを含む健康補助食品、薬剤もしくは食物の摂取または摂取量の適否を判定する方法。

7. 前項4または5に記載の方法を用いる、脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内合成もしくは代謝に対する効果または作用を有する治療薬剤の投与または投与量の適否を判定する方法。

8. 唾液が、耳下腺唾液である、前項1〜7のいずれかに記載の方法。

9. 耳下腺唾液が、耳下腺唾液を選択的かつ定量的に採取する唾液採取具で採取されたものである、前項8に記載の方法。

10. 唾液採取具が、(a)唾液を不可逆的に吸収する吸収体からなる採取部と、(b)吸収体に採取された唾液の量を定量する定量部、を有することを特徴とする、前項9に記載の方法。

11. 唾液採取具が、さらに唾液の保存料溶液を含み唾液を吸収した吸収体を該溶液に浸漬して保存する保管容器部を有することを特徴とする、前項10に記載の方法。

12. 唾液の保存料溶液が、水溶性の有機溶媒であることを特徴とする、前項11に記載の方法。

13. 検査が、

(a)採取された唾液、該唾液を吸収した吸収体及び／又は該吸収体を保存した保存料溶液を、水溶性の有機溶媒、炭化水素系の有機溶媒、またはイソプロパノールと酢酸エチルの混合液、で抽出する工程、

(b)抽出液を分析試料とし、高速液体クロマトグラフィーにより脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを分離する工程、

(c)分離した脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを検出する工程、を含むことを特徴とする、前項1〜12のいずれかに記載の方法。

14. 脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターが、CoQ10、リコペン、 $\beta$ -カロテンおよびトコフェロールからなる群から選ばれる少なくとも一つの物質である、前項1〜13のいずれかに記載の方法。

15. 前項1〜14のいずれかに記載の方法を使用する薬剤または健康補助食品のス

クリーニング方法。

## 発明の効果

[0006] 本発明で提供された方法は、唾液からトコフェロールや $\beta$ -カロテン等の脂溶性ビタミン及び／またはリコペンやCoQ10等の脂溶性フードファクターの分析を可能とし、健康補助食品等の摂取において、健康補助食品等に含まれる栄養成分であるこれらの脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内移行を簡易に検査可能とする。すなわち、本発明の方法によると、健康補助食品もしくは薬剤の摂取量に応じて、唾液中の目的とする脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの増加を確認できた。これにより、食事等の栄養価評価、健康補助食品もしくは薬剤の摂取による脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内移行度の程度の判定が唾液によって非侵襲的に可能となり、また、投与された治療薬剤の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内合成もしくは代謝に対する効果または作用の判定が唾液によって非侵襲的に可能となり、本発明は、薬剤もしくは健康補助食品開発等に利用可能である。さらに、本発明の方法により、脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを含む健康補助食品、薬剤もしくは食物の摂取の適否や、脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内合成もしくは代謝に対する効果または作用を有する治療薬剤の投与の適否の判定が非侵襲的に可能となる。

## 図面の簡単な説明

[0007] [図1]試料注入より濃縮時までの分離システム構成機器、移動相およびカラムの相互接続関係を示す。

[図2]濃縮カラムからの溶出時より分離精製時までの分離システム構成機器、移動相およびカラムの相互接続関係を示す。

[図3]サプリメント摂取者(唾液A)、非摂取者(唾液B)およびトマトジュースの日常的愛飲者(唾液C)の試料のクロマトグラムを示す。

[図4]図3の拡大によりリコペンおよび $\beta$ -カロテンのピークを拡大図として示す。

[図5]血漿と耳下腺唾液中のCoQ10測定値間の相関性を示す。

[図6]血漿と直接採取唾液中のCoQ10測定値間の相関性を示す。

[図7]CoQ10含有サプリメント摂取状況による耳下腺唾液中CoQ10値の推移を示す。

[図8]トコフェロール含有サプリメント摂取前、摂取中および摂取中止時における耳下腺唾液中トコフェロール値の推移を示す。

[図9]リコペンおよび $\beta$ -カロテン含有野菜ジュース摂取前、摂取中および摂取中止時における耳下腺唾液中リコペン値の推移を示す。

[図10]リコペンおよび $\beta$ -カロテン含有野菜ジュース摂取前、摂取中および摂取中止時における耳下腺唾液中 $\beta$ -カロテン値の推移を示す。

[図11]不良な過塩素酸塩を用いて調製した移動相への有機酸類添加によるCoQ10標準品溶液のクロマトグラム改善効果を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

[0008] 以下に記載する詳細な説明は、本発明の実施態様の一例(代表例)であり、これらの内容に特定はされない。

本発明の本質は、唾液という非侵襲的に採取可能な検体が、健康補助食品等の摂取において、健康補助食品等に含まれる脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内移行を検査するために有用であるということを見出したことにある。なお、本発明では、測定値を求める行為および測定値を求める方法をそれぞれ分析、分析法と称し、個々の試料および複数試料の分析により得られた値を測定値と称する。

また、本発明で対象とする脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターとは、具体的には脂溶性ビタミンとしてはビタミンEであるトコフェロールやビタミンAのプロビタミンである $\beta$ -カロテン等が、脂溶性フードファクターとしては生体内合成可能なCoQ10やビタミンではないため摂取を必須としないが積極的な摂取による健康維持増進効果を期待される抗酸化物質のリコペン等が例示される。

検体は、採取された唾液であり、特に好ましくは耳下腺唾液である。この耳下腺唾液をより選択された環境下で採取することによって、より正確な数値を得ることができる。唾液は、その約70%程が舌下腺及び顎下腺から分泌され、残りの約30%程度が耳下腺より分泌される。この耳下腺唾液をより選択的に採取することにより、本発明



の目的は達成できる。この採取のためには、既に市販の唾液採取具（例えば、Saliva-sampler（Saliva Diagnostic Systems Inc.）、Orasure（Orasure Technologies、Inc.、特表平5-506925号）、Salivet（アシスト社製））を使うことが可能であるが、その形態は少なくとも、耳下腺唾液の口腔内出口部位により選択的に接触可能なものがよい。例えば、採取部が扁平であれば、唾液採取により好適である。耳下腺唾液採取には、例えば歯列と頬内側に吸収体を挟んで行う。唾液採取量は、採取具の吸収体の種類により変更されるが、相対的な数値を得るためには、特定の吸収体を使い、吸収体に脂溶性ビタミン及び/又は脂溶性フードファクターが吸着するため、一定量の吸収体に対し一定量の唾液と接触させることが必須である。即ち、採取者による吸収体と唾液接触量の比率が一定に保つように配慮され、かつ溶媒を添加して分析試料を液体として回収できる吸収体使用量とすることが必要である。具体的には、唾液を不可逆的に吸収する吸収体を用いるのが好ましく、例えば、毛細管現象を利用した吸収体が挙げられる。

また、採取具は、採取量の一定化を図るために採取インジケータのような機能を付加してもよい。これは例えば採取された唾液量が毛細管現象等で確認できる手段を意味する。吸収体としては、吸水性がありエタノールのようなアルコール類に溶解しないものであればポリエステル繊維や発砲ウレタンのような人工高分子素材および脱脂綿・紙・パルプのような天然素材のいずれも利用できるが、綿素材が最適である。また、採取具に、唾液を吸収させた吸収体を保存する保管容器部を付加してもよく、さらにこの保管容器部は該吸収体を浸漬して保存するために唾液の保存料溶液を含んでいてもよい。保存料溶液は、水溶性の有機溶媒であればいずれでもよい。例えば、エタノール、メタノールまたはイソプロパノールなどの低級アルコール類が挙げられる。被験者から唾液を採取した採取具を分析機関が郵送で回収する場合は、郵便法等の規定で可燃物や毒劇物に該当しない濃度のエタノールが望ましい。また、採取具も郵送が可能なものであればいずれでもよいが、定形郵便として郵送できる形状のものが望ましい。また、唾液分泌の生理的影響の少ない耳下腺唾液検体を採取するため、唾液採取の時期は、唾液分泌が盛んに行われた食後すぐよりも唾液分泌状態の安定している食間が好ましく、特に食後2時間以上経ってから採取することが望

ましい。

[0009] 採取された唾液は、採取具のまま保管容器に保存され、例えば分析機関等に回収され分析に付される。目的物質である脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの分析は、採取具から脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを抽出分離して検出し定量すればよいが、具体的には、(a)採取された唾液、該唾液を吸収した吸収体及び／又は該吸収体を保存した保存料溶液を溶媒で処理して脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを抽出する工程、(b)抽出液から例えば高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを分離する工程、(c)分離した脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを例えばUV検出器や電気化学検出器(ECD)等の微量検定に適した公知の分析法で検出し定量する工程、を含む方法を挙げることができる。

抽出に用いる溶媒は、採取された唾液、該唾液を吸収した吸収体及び／又は該吸収体を保存した保存料溶液から、タンパク質を除去しながら、目的の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを抽出できるものが好ましい。CoQ10やトコフェロールのような水にわずかに溶解する脂溶性ビタミン及び／または脂溶性フードファクターの場合は、上記の水溶性溶媒がより好ましく、特に抽出に好ましい濃度の水溶性溶媒、具体的には少なくとも75%の最終濃度を与えるエタノールが最適の溶媒である。その他、溶媒としては、UV検出器よりも高感度なECD検出器に利用可能であるメタノールおよびイソプロパノール等も使用できる。また、リコペンや $\beta$ -カロテンなどの水又はエタノールと水の混合液へ極めて溶解しにくい脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの場合、炭化水素あるいは酢酸エチルとイソプロパノールの混合溶液あるいはイソプロパノールを使用することにより良好な抽出を行うことができる。

例えば抽出方法は、唾液1mlを吸収した吸収体に対して、溶媒としてエタノールでは3倍体積量以上(約66%以上)を添加し、接触させる。イソプロパノールおよびメタノールでは唾液に対して5倍液量以上を接触させることが必要である。吸収体から脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターは、すみやかに抽出され、また長時間経過しても再吸着することはない。唾液1mlに対する脱脂綿使用量は約250mgが好

適である。抽出された検体は、そのまま或は遠心分離して凝集したタンパクを除去した上清を回収するような前処理を施し、分析に供させる。

[0010] 脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを含む健康補助食品等を摂取している被験者を対象とし、このような分析により得られた唾液中の数値(濃度)は、摂取された健康補助食品、薬剤又は食物に含まれる脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内の移行状態を示しており、この数値を例えば健康補助食品、薬剤又は食物を摂取前の被験者の唾液中の数値や、健康補助食品、薬剤又は食物を摂取していない対照群の唾液中の数値の平均値等と比較することにより、脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内移行を検査することができ、すなわち被験者の健康状態、被験者の吸収力あるいは栄養化力等を判定可能である。また、健康補助食品、薬剤もしくは食物の摂取または摂取量の適否を判定する方法を提供する。

さらに、脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内合成もしくは代謝に対する効果または作用を有する治療薬剤を投与している被験者が対象の場合は、このような分析により得られた唾液中の数値を、該治療薬剤の効果または作用の指標とすることができる。すなわち、この数値を例えば治療薬剤を投与前の被験者の唾液中の数値や、該治療薬を投与していない対照者群の唾液中の数値の平均値等と比較すれば良い。また、該治療薬剤の投与または投与量の適否を判定する方法を提供する。例えば、CoQ10の生体内合成もしくは代謝に対する効果または作用を有する治療薬剤として、メバロチン(三共社製)やリピトール(ファイザー社製)などのスタチン系薬剤が知られており、これらの治療薬剤を投与している被験者の唾液中のCoQ10の数値を、これらの治療薬剤の効果または作用の指標とすることができる。

さらに、このような分析方法は、摂取された脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内移行の追跡を可能とし、創薬もしくは新規な健康補助食品のスクリーニング方法として使用可能である。

ここで、対照群の唾液中の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの数値(濃度)の平均値を基準とする判定には、一例として、対照群の平均値の標準偏差を用いることができる。例えば、CoQ10を摂取している被験者の唾液中のCoQ10の値

が、対照群の平均値プラス2SDをはるかに超えたなら摂取量を減らし、平均値マイナス2SDと平均値プラス2SDの間であれば摂取量を増やす、といった指標とすることができる。さらに後日再度唾液を採取してCoQ10の値の検査を行うことを繰り返してもよい。

## 実施例

[0011] 以下実施例をあげて本発明を説明する。以下の実施例では、健康補助食品等に含まれる栄養成分の代表例として、CoQ10及びトコフェロールを使って効果の確認をおこなったが、本発明は、脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターに適用可能であり、本発明の範囲はこれらの実施例により限定されるものではない。なお、実施例で、検体中のCoQ10、トコフェロール、リコペン、 $\beta$ -カロテンは次のように分析した。

[0012] (分析条件)

HPLCは血漿中CoQ10分析法である既知の方法 (Analytical Biochemistry Vol.250、p66-73、1997)を参考とし、唾液分析に適するように改良を加えて実施した。

[0013] 前処理およびオートサンプラーへの搭載

検体の前処理は、オートサンプラーバイアル(サンプラーバイアルPP 250  $\mu$ l:資生堂社製)に血漿20  $\mu$ lとエタノール(和光純薬製:HPLCグレード)180  $\mu$ lを加えエタノール終濃度90%(V/V)とし、5分間1000Gにて冷却遠心分離によりタンパクを沈殿させて行った。直接採取した唾液では、検体50  $\mu$ lにエタノール150  $\mu$ lを加え、エタノール終濃度75%(V/V)とし、5分間1000Gにて冷却遠心分離によりタンパクを沈殿させて行った。Saliva-samplerを用いて採取した耳下腺唾液の場合は、唾液液量として1ml吸着されるので、これに3mlのエタノール(HPLCグレード)を加え15分間の転倒混和した後、200  $\mu$ lをオートサンプラーバイアル(サンプラーバイアルPP 250  $\mu$ l:資生堂社製)に分取し、5分間1000Gにて冷却遠心分離によりタンパクを沈殿させて行った。遠心分離されたオートサンプラーバイアルは、オートサンプラーに搭載しHPLCに供した。

[0014] (使用カラム)

HPLCには以下の3種類のカラムを用意した。

1. 濃縮カラム:CAPCELL PAKC18 AQ  $5\mu\text{m}$   $\phi 2.0 \times 35\text{mm}$ (資生堂社製)
2. 分離カラム:CAPCELL PAKC18 AQ  $3\mu\text{m}$   $\phi 2.0 \times 150\text{mm}$ (資生堂社製)
3. 還元カラム:SHISEIDO CQ ID  $2.0\text{mm} \times 20\text{mm}$ (資生堂社製)

濃縮カラムは、試料中分析目的成分の濃縮と親水性夾雑物質除去のために使用する。分離カラムは各成分を純化精製し単一成分として検出するために使用する。還元カラムは、ユビデカレノン(CoQ10)をユビデカレノールへ還元させるために使用する。還元処理は、CoQ10をトコフェロール、リコペンあるいは $\beta$ -カロテンといったOH基を有する脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの一斉分析を行う場合は特に有用であるが、UV検出器を用いて検出する場合は特に必要ではない。

一斉分析を必要としない場合、例えば唾液中CoQ10のみを分析する場合は、濃縮カラムとしてCAPCELL PAKC8 DD S-5  $\phi 4.0 \times 10\text{mm}$ (資生堂社製)、分離カラムとしてCAPCELL PAK AQ  $3\mu\text{m}$   $\phi 2.0 \times 100\text{mm}$ (資生堂社製)を用い良好な検出定量を行うことが可能である。

[0015] (移動相)

カラム展開用溶媒として以下を用意した。

移動相1:メタノール950mlと蒸留水50mlに無水過塩素酸ナトリウム6.122gの割合で混合溶解させ、超音波減圧脱気した後使用する。

移動相2:メタノール950mlとイソプロパノール50mlに無水過塩素酸ナトリウム6.122gの割合で混合溶解させ、超音波減圧脱気した後使用する。

移動相1は、試料注入後に濃縮カラムに送液し、分析目的成分をカラムに保持させ、前処理では除去しきれない分析試料中に残存するタンパク質、ポリペプチド、アミノ酸、有機酸、糖類および塩類等の親水性夾雑成分を除去し、さらに生体試料中に多量に含まれる分析目的成分ではないコレステロール、脂肪酸、リン脂質および中性脂質等の疎水性成分を有効に流去させる目的で使用される。移動相2は、試料注入

時から濃縮カラムでの夾雑成分除去プロセス完了時まで分離カラムに通液させておき、除去プロセス完了後、直ちにカラムスイッチングにより濃縮カラムに逆流させることによって分析目的成分を一気に溶出させ、同時に分離カラムに分析目的成分を送り込み純化精製し、単一分画化させる目的で使用される。

- [0016] 移動相1の調製にあたっては、メタノールに対する蒸留水混合割合を増やすと疎水性夾雑成分の除去に支障を生じ、混合割合を減らすと親水性夾雑成分の除去に支障を生ずることに注意を要す。なお、移動相2のメタノールに対するイソプロパノールの混合割合を95:5から90:10あるいは80:20と増やしても、濃縮カラムからの溶出、分離カラムでの成分分離に大きな影響はない。無水過塩素酸ナトリウム添加量は、調製後の濃度を50mMとするために6.122g使用しており、6gあるいは7gであってもかまわない。過塩素酸ナトリウムは無水物ではなく水和物であってもよい。ただし、移動相を調製するために使用する試薬は、唾液中の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクター濃度は血中に比べ低濃度であるため、クロマトグラムのノイズを大きくしないメーカーおよびロットのものを選んで用いる必要がある。あるいは、移動相に蟻酸ナトリウムあるいは酢酸ナトリウムといった有機酸を少量加えると良い。移動相1および移動相2への有機酸の添加量は、検量線の低濃度側から高濃度側まで問題なく測定可能な、1～10mM、好ましくは3～7mM、より好ましくは5mMである。

[0017] (分離方法)

分離方法は、図1に示した濃縮工程と図2に示した分離定量工程からなる。試料注入から濃縮時までの分離システム構成機器、移動相およびカラムの相互接続関係を図1に示した。濃縮カラムからの溶出時から分離生成時までの分離システム構成機器、移動相およびカラムの相互接続関係を図2に示した。図1および図2の中で、移動相1の流れは黒い矢印で、移動相2の流れは灰色の矢印で示されている。還元カラムおよび分離カラムの接続順序は、目的により逆にしてもよい。例えば唾液中CoQ10を測定する場合、還元カラム分離カラムの順であっても分離カラム還元カラムの順であってもよい。保持時間の短い不純物を多く含む試料の場合、採取された唾液中にはユビデカレノールがほとんど検出されないため、保持時間の長いCoQ10として分離した後、ユビデカレノールに還元してから検出すると、ピークの分離が良い。試

料および標準品はオートサンプラー(商品名:HTSオートサンプラー、資生堂社製)を用いて注入する。流路切り替えはシステムコントローラー(商品名:EZChrom、資生堂社製)を用いてプログラム設定し、自動運転させて分離分析を行うことができる。移動相1、2の送液には、それぞれ1台ずつのポンプ1、2(商品名:ポンプ3001、資生堂社製)、計2台を使用する。流速は、分析開始から終了時まで、移動相1は200  $\mu$  l毎分の速さ、移動相2は流速400  $\mu$  l毎分とした。分析中には、移動相1、2に気泡が発生しないよう、3経路型減圧脱気装置(商品名:SSC3215、センシウ科学社製)を通過させた移動相を通液させる。また、還元カラムと分離カラムは直列に接続し、カラムオープン(商品名:タイプ3004、資生堂社製)内で40℃恒温状態に維持する。六方バルブ1には、リンスバルブ(商品名:タイプ3034、資生堂社製)、六方バルブ2には高圧切り替え六方バルブ(商品名:タイプ3011、資生堂社製)をそれぞれ用いる。オートサンプラーはHTSオートサンプラー(資生堂社製)を用い、システム全体のプログラム設定制御管理および数値処理には、EZChrom(資生堂社製)を用いる。

[0018] (検出方法)

ユビデカレノール、トコフェロール、リコペンおよび $\beta$ -カロテンは600mVで定量的に分析可能である。アンペロメトリー式電気化学検出器3005(資生堂社製)やパルス式電気化学検出器3016(資生堂社製)を用い、図1および図2に示したHPLC条件で、唾液中にカルボニル基を有するCoQ10とOH基を有するトコフェロール、リコペンおよび $\beta$ -カロテンが混在するため、前述の市販のオンライン還元カラムを用いてCoQ10のカルボニル基をOH基へ還元しユビデカレノールに変換してから酸化モードで検出することにより図3、図4に示すように一括検出することが可能である。

ECD検出器は毎分析前に、Sensitivityを0.1にTime Constantを標準(Std.)に設定し、ベースラインの水準が1nA程度に維持できることを確認して使用した。UV検出器あるいは蛍光検出器は試料中存在量が多いトコフェロールの分析に便利である。設定すべき検出波長は、既知の波長で十分である。ECD検出器とUVあるいは蛍光検出器を共存させて接続して定量的に分析する場合は、図1、図2のようにドレイン直前にECD検出器を接続し、ECD検出器以降の背圧変化が小さくなるようにする。これによりECD検出信号のノイズを小さく押さえられ、感度良く定量的に分析

することが可能となる。

[0019] (検量線、感度および試料注入量)

アンペロメトリ式電気化学検出器3005(資生堂社製)やパルス式電気化学検出器3016(資生堂社製)を用いた場合、CoQ10、 $\alpha$ -トコフェロール、ユビデカレノール、リコペンおよび $\beta$ -カロテンは1.56~200ng/mlを含むように調製した混合標準品を20 $\mu$ l注入し、直線回帰可能な検量線を作成した。試料注入量は、オートサンプラーとしてHTSオートサンプラー(資生堂社製)を用いた場合、標準的には20 $\mu$ lであるが、濃厚試料では2 $\mu$ l注入で、希薄試料では150 $\mu$ l注入して分離定量することができる。感度は、前処理した試料の濃縮倍率を上げ、試料注入量を増やすことで所望するレベルに変えることができる。

[0020] 実施例1

耳下腺唾液検体A、BおよびCの試料のクロマトグラムを図1に示し、リコペン、 $\beta$ -カロテンおよびCoQ10のピークを見やすくするため図1の拡大図を図2に示した。耳下腺唾液検体Aの試料のクロマトグラムは、市販CoQ10サプリメントであるコーキユーリブロン(商品名、日清ファルマ社製。以下、「サプリメントN」と称することがある)を毎朝晩7時に1錠、1ヶ月摂取しているボランティアの耳下腺唾液を採取し、唾液1mlに対しエタノール3mlを加えて除タンパクした上清を50 $\mu$ l注入して得たものである。なお、サプリメントNの脂溶性ビタミンおよび脂溶性フードファクターの含量は、CoQ10として30mg/1錠、 $\alpha$ -トコフェロールとして10mg/1錠である。1日当たりのサプリメントからの摂取量は、CoQ10として60mg、 $\alpha$ -トコフェロールとして20mgである。一方、耳下腺唾液検体Bの試料のクロマトグラムは、市販サプリメントを一切摂取していないボランティアの耳下腺唾液1mlに対しエタノール3mlを加えて除タンパクした上清50 $\mu$ lで行った。さらに、唾液Cの試料のクロマトグラムは、市販トマトジュースを毎日一缶(180ml入り)摂取しているボランティアに、銘柄を指定(商品名:缶熟トマト 食塩無添加、伊藤園社製)して1週間摂取させた後に採取した耳下腺唾液1mlに対しエタノール3mlを加えて除タンパクした上清50 $\mu$ lを注入して得たものである。1缶中の表示含量はリコペン20mg、 $\beta$ -カロテン1.8mgであった。

図1の耳下腺唾液AとBの試料のクロマトグラム上のトコフェロールとCoQ10のピー



クを比較すると、サプリメント摂取者Aの方が大きい。また図2の耳下腺唾液BとCの試料のクロマトグラムを比較すると明らかにトマトジュース常用者リコペンおよび $\beta$ -カロテンのピークが大きい。従って、摂取量の多いボランティアでは耳下腺唾液中の濃度も高くなっており、唾液中の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを分析することは、摂取された健康補助食品等に含まれる脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内への移行程度の判定に有用である。

[0021] 実施例2 (CoQ10摂取試験その1)

ボランティア11名に市販CoQ10サプリメントであるQ10AA Multi(商品名、資生堂社製。以下、「サプリメントS」と称することがある)を1週間連続して毎朝7時に2錠(CoQ10の2錠中含量100mg)を経口摂取させた。なお、サプリメントSの脂溶性ビタミンおよび脂溶性フードファクターの含量は、CoQ10として50mg/1錠、 $\alpha$ -トコフェロールとして16.4mg/1錠である。そして、摂取開始前、摂取1週間後および摂取中止2週間後の3回、午後4から5時の間に耳下腺唾液、直接採取唾液およびヘパリン加血漿の採取が行われた。唾液の採取は、水で口をすすいだ後、5分間椅子に座り安静にしこの間に口腔内に溜まった唾液を吐き捨てて、口腔内の初期化を行ってから実施した。直接採取唾液は、口腔内に溜まった唾液を直接採取唾液として約1ml採取した。耳下腺採取唾液は、舌下に脱脂綿2gを咥えさせ、舌下腺・顎下腺の唾液混入の起こらないようにして、コットン製の唾液吸収体と色変化で採取終了を知らせるインジケータからなるSaliva-samplerを耳下腺開口部の近くである歯列と頬の間に挟みこませ、椅子に座らせ安静静粛状況にて採取した。Saliva-samplerを用いたときに採取された唾液量の11人での平均は1ml、変動幅は0.9~1.1mlと良好な再現性を示した。耳下腺採取唾液中CoQ10分析は、唾液を吸収させたSaliva-samplerを専用チューブに移し、これに3mlのエタノールを加え、終濃度75%とし、10分間転倒混和を行い吸収体からの抽出とタンパクの凝固を行った後、吸収体の断片と不要なタンパクを4℃、1000Gにて遠心分離して除去した上清20  $\mu$ lをHPLCに供した。なお、耳下腺唾液採取の際に、舌下に脱脂綿2gを咥えることは必須ではなく、実施例3に示すように、舌下腺・顎下腺唾液を嚥下により飲み込むことで、混入を回避することができる。直接採取唾液の前処理は、250  $\mu$ lの検体にエタノール750

$\mu$  lを加えて混合し、4℃、1000Gにて5分間遠心分離により除タンパクを行い、上清20  $\mu$  lをHPLCに供した。血漿の前処理は、血漿20  $\mu$  lにエタノール180  $\mu$  lを加えて混合し、不要なタンパクを4℃1000Gにて遠心分離して除去した上清20  $\mu$  lをHPLCに供した。

[0022] 実施例3 (CoQ10摂取試験その2)

CoQ10摂取試験は、1錠中にCoQ10を50mg含有する市販サプリメントSおよび1錠中に30mg含有する市販サプリメントNを用いて行った。ボランティアS群の10名には、サプリメントSを、ボランティアN群の10名にはサプリメントNを摂取させた。サプリメントSの摂取は、各ボランティアに1週間連続して毎朝9時に2錠を経口摂取させ、次の1週間連続して毎朝9時に倍量の4錠を経口摂取させた後、2週間摂取を中止させて行った。サプリメントNの摂取は、1週間連続して毎朝9時に3錠を経口摂取させ、次の1週間連続して毎朝9時に倍量の6錠を経口摂取させた後、2週間摂取を中止させて行った。検体は、S群およびN群ともに摂取開始前、摂取1週間後、倍量および摂取中止2週間後の計4回、午後4から5時の間に耳下腺唾液およびヘパリン加血漿を採取した。耳下腺唾液は、採取前に水で口をすすいだ後、5分間椅子に座り安静にしこの間に口腔内に溜まった唾液を吐き捨てて、口腔内の初期化を行ってから採取した。耳下腺唾液の採取は、Saliva-samplerを耳下腺開口部の近くである歯列と頬の間に挟みこませ、椅子に座らせ安静静粛状況にて採取した。この際、舌下腺・顎下腺の唾液混入を防ぐため舌下腺・顎下腺から分泌されて下顎に溜まった唾液を嚥下により飲み込むことにより、混入を回避して耳下腺唾液採取は行われた。耳下腺採取唾液中CoQ10分析は、唾液を吸収させたSaliva-samplerを50%エタノール1ml含む専用チューブに移し、これに4mlのエタノールを加え、終濃度75%とし、10分間転倒混和を行い吸収体からの抽出とタンパクの凝固を行った後、吸収体の断片と不要なタンパクを4℃、1000Gにて遠心分離して除去した上清150  $\mu$  lをHPLCに供した。血漿の前処理は、血漿20  $\mu$  lにエタノール180  $\mu$  lを加えて混合し、不要なタンパクを4℃、1000Gにて遠心分離して除去した上清20  $\mu$  lをHPLCに供した。なお、2週間摂取を中断させたときの検体をボランティアN群の1名(N4)から採取できなかったため、唾液および血漿それぞれの検体総数は79である。

[0023] 実施例4(血中値と唾液含有量の相関性の実験)

図5に示すように、実施例2および実施例3で得られた112検体の耳下腺唾液と血漿のCoQ10の濃度(以下、測定されたCoQ10の濃度を「CoQ10値」と称する)の間に良好な相関性のあることが確認された。また、図6に示すように、直接採取唾液と血漿のCoQ10値間の相関性は弱いながらも認められた。これにより、唾液、特に耳下腺唾液中の数値を分析すれば、栄養補助食品等の生体内移行量をより正確に判定できることが確認された。

[0024] 実施例5(CoQ10含有サプリメント摂取状況による耳下腺唾液中CoQ10値の推移)

実施例4のサプリメントN摂取状況を摂取開始前、摂取1週間後、倍量摂取1週間後および摂取中止2週間後として横軸に配し、縦軸に耳下腺唾液のCoQ10値を取り、CoQ10含有サプリメント摂取状況による耳下腺唾液中CoQ10値の推移を図7に示した。一般に、CoQ10は食後摂取したほうが生体内中移行しやすく、効率的に摂取するには食後30分以内に摂取したほうが良いとされている。図7のボランティアN1は、ここ数年間毎朝食を取らない習慣の者であり、ボランティアN5も朝食を頻繁に欠食する習慣の者であり、CoQ10サプリメントを摂取しても効率的な生体内中移行を期待できない例である。N1およびN5の耳下腺唾液のCoQ10値は、サプリメント摂取量を増やしてもほとんど上昇しておらず、妥当な挙動が確認できた。ボランティアN9は毎朝食を午前6時頃に定期的に摂取する者であるが食後3時間程度経過した午前9時にサプリメントを摂取したため、効率的な摂取とならず、耳下腺唾液のCoQ10値はサプリメント摂取しても値の上昇は小さかったと考えられる。その他7例のボランティアの場合は、耳下腺唾液中のCoQ10値は、CoQ10含有サプリメント摂取により上昇し、摂取量を増やすとさらに上昇し、摂取中断後に低下して摂取状況を反映した推移を示すことが確認された。このことより、CoQ10サプリメントの適正摂取の判断基準として、耳下腺唾液のCoQ10値の検査が有用であることを示していると結論される。

[0025] 実施例6(サプリメント非摂取者の耳下腺唾液CoQ10値の平均値とSDの個人別摂取量設定のための基準としての利用)

CoQ10サプリメントを効率的に吸収するのに適しているとされる食後30分以内に摂取しても、吸収に大きな個人差があるため、同一商品を同量摂取しても血中濃度上

昇に差があることが知られており、個人ごとに適正な摂取量を判断できる基準が求められている。CoQ10サプリメント非摂取者の耳下腺唾液中CoQ10値の平均値とSD（標準偏差）が基準の一例として有用であることが、図7より容易に理解できる。例えば、食後適正な時間にCoQ10サプリメントを摂取している人が、非摂取者の血中CoQ10値の上限まで血中濃度を上昇させることを目的に摂取する場合を例に説明する。耳下腺唾液のCoQ10値が、平均値プラス2SDをはるかに超えたなら摂取量を減らし、平均値マイナス2SDと平均値プラス2SDの間であれば摂取量を増やし、後日再度耳下腺唾液を採取してCoQ10値の検査を行うことを繰り返すことにより目的を達成することができる。なお図7の平均値および2SDは、CoQ10サプリメント非摂取者55名の耳下腺唾液のCoQ10値をから得た値であり、平均値は17.0ng/ml、2SDは13.5ng/mlである。

[0026] 実施例7（トコフェロール含有サプリメント摂取前、摂取中および摂取中止時における耳下腺唾液中トコフェロール濃度の推移）

トコフェロールを2錠中に $\alpha$ -トコフェロールとして32.8mg含有する市販CoQ10サプリメントSをボランティア3名に1週間連続して毎朝7時に2錠経口摂取させ、検体として、摂取開始前、摂取1週間後および摂取中止2週間後の3回、午後4から5時の間に耳下腺唾液の採取を行った。唾液の採取は、水で口をすすいだ後、5分間椅子に座り安静にし、この間に口腔内に溜まった唾液を吐き捨てて、口腔内の初期化を行ってから実施した。耳下腺唾液の採取は、Saliva-samplerを耳下腺開口部の近くである歯列と頬の間に挟みこませ、椅子に座らせ安静静粛状況にて採取した。この際、舌下腺・顎下腺の唾液混入を防ぐため舌下腺・顎下腺を嚥下により飲み込むことにより、混入を回避して耳下腺唾液採取は行われた。耳下腺採取唾液中トコフェロール分析は、唾液を吸収させたSaliva-samplerを空の専用チューブに移し、これに4mlのイソプロパノールを加え、終濃度80%とし、10分間転倒混和を行い吸収体からの抽出とタンパクの凝固を行った後、吸収体の断片と不要なタンパクを4℃、1000Gにて遠心分離して除去した上清20 $\mu$ lをHPLCに供した。

サプリメント摂取状況を摂取開始前、摂取1週間後および摂取中止2週間後として横軸に配し、縦軸に耳下腺唾液のトコフェロールの濃度（以下、測定されたトコフェロー

ルの濃度を「トコフェロール値」と称する)を取り、トコフェロール含有サプリメント状況による耳下腺唾液のトコフェロール値の推移を図8に示す。耳下腺唾液のトコフェロール値は、摂取状況を反映して摂取により上昇し、摂取中止により低下することが確認された。

[0027] 実施例8(リコペンおよび $\beta$ -カロテン含有市販サプリメント摂取前、摂取中および摂取中止時における耳下腺唾液リコペンおよび $\beta$ -カロテン濃度の推移)

1錠中にリコペンを10mgと $\beta$ -カロテンを30mg含有する市販サプリメントであるリコペン+ $\beta$ -カロテンMAX1(商品名、ミナミヘルシーフード社製)をボランティア3名の内2名に1週間連続して毎朝7時に2錠(2錠中含量リコペンを20mgと $\beta$ -カロテンを60mg)を経口摂取させ、検体として、摂取開始前、摂取1週間後および摂取中止2週間後の3回、午後4から5時の間に耳下腺唾液の採取を行った。唾液の採取は、水で口をすすいだ後、5分間椅子に座り安静にしこの間に口腔内に溜まった唾液を吐き捨て、口腔内の初期化を行ってから実施した。耳下腺唾液の採取は、Saliva-samplerを耳下腺開口部の近くである歯列と頬の間に挟みこませ、椅子に座らせ安静静粛状況にて採取した。この際、舌下腺・顎下腺の唾液混入を防ぐため舌下腺・顎下腺を嚥下により飲み込むことにより、混入を回避して耳下腺唾液採取は行われた。耳下腺採取唾液中リコペンおよび $\beta$ -カロテンの分析は、唾液を吸収させたSaliva-samplerを空の専用チューブに移し、これに4mlのイソプロパノールを加え、終濃度80%とし、10分間転倒混和を行い吸収体からの抽出とタンパクの凝固を行った後、吸収体の断片と不要なタンパクを4℃、1000Gにて遠心分離して除去した上清150 $\mu$ lをHPLCに供して行った。

サプリメント摂取状況を摂取開始前、摂取1週間後および摂取中止2週間後として横軸に配し、縦軸に耳下腺唾液のリコペンの濃度および $\beta$ -カロテンの濃度(以下、測定されたリコペンまたは $\beta$ -カロテンの濃度をそれぞれ「リコペン値」、「 $\beta$ -カロテン値」と称する)を取り、図9および図10に、サプリメント摂取による耳下腺唾液のリコペンおよび $\beta$ -カロテン値の推移を示す。耳下腺唾液のリコペンおよび $\beta$ -カロテン値は、非摂取ボランティア1名に比べ摂取したボランティア2名では摂取状況を反映して明らかな上昇を示し、摂取中止により低下することが確認された。

## [0028] 実施例9(耳下腺唾液の吸収体素材と抽出の必要性)

実施例2の検体調製法において唾液の吸収体の素材について比較検討を行った。吸収体50mgを唾液600  $\mu$  lに浸漬し、吸収体からしみでた唾液中のCoQ10濃度を分析するため20  $\mu$  lを分取し、これにイソプロパノール180  $\mu$  lを加えて混合し、4℃、1000Gで5分間の遠心分離により除タンパクを行い、上清20  $\mu$  lをHPLCに供した。CoQ10分析結果を「吸収体50mgを唾液600  $\mu$  lに浸漬し、吸収体の隙間に保持された唾液中のCoQ10濃度」として表1に示す。耳下腺唾液の分泌は1mlの分泌に要する時間は短い人で3分間ほど、長いボランティアでは10分以上要したため、吸収体を用いることなく採取することは実施上困難である。この際、用いる唾液吸収体の素材、ポリエステル、コットンおよびアセチルセルロースの何れにたいしても脂溶性フードファクターや脂溶性ビタミンの吸着は起こる。また低吸着性のポリウレタンであっても唾液中の水分を結合水として補足してしまうため濃縮が起こり、見かけ上高い値を示す(表1参照)。従って、吸着した成分を抽出させることが必要となる。また、例えば、2mlの唾液と接触したにコットン製の吸収体が、隙間に1mlの唾液を含んでいたとして実際には2mlの唾液中に含まれていた成分を吸着してしまうため、抽出を行うと唾液1mlと接触したときよりも高値結果を与えることとなることが明らかとなった。このことは、口腔内で一定量の吸収体に一定量の唾液を吸収させなければならないことを意味する。従って、唾液の採取は、Saliva-samplerなどの吸収体の毛細管現象により一度吸収された唾液画の吸収体からの漏れ出しの起こらないものを用い、かつ一定容量の唾液を吸収するとインジケータの色の変化などで正確な採取量を知ることができる採取具を用いるべきである。

[表1]

処理条件	CoQ10(ng/ml)	回収率(%)
唾液(コントロール)	33.7	100
コットン	3.4	10.2
ポリエステル	19.6	58.2
ポリウレタン	59.8	178
アセチルセルロース	2.5	7.3

## [0029] 実施例10

(除タンパク質溶媒の違いによる抽出効果の確認)

実施例1及び2の検体調製法において、溶媒をエタノール(90、75、50%)、イソプロパノール(90、75、50%)、又はメタノール(90、75、50%)を使って比較検討した。50mgの吸収体に唾液600  $\mu$  lと各溶媒を600、1800および5400  $\mu$  l加え、各々終濃度50、75および90% (V/V)として混合攪拌した後、4℃、1000Gで遠心分離した上清20  $\mu$  lを用いHPLCにてCoQ10の分析を行った。その結果、以下の表2「3種類の溶媒、3濃度レベルで唾液を除タンパクして得られた上清中のCoQ10濃度(ng/ml)」の数値を得た。75%濃度でもタンパク質への吸着による影響がみられない抽出効率の良いエタノールが最適と考えられた。

[表2]

除タンパクに用いた溶媒濃度(V/V%)	溶媒別CoQ10回収量(ng/ml)		
	イソプロパノール	エタノール	メタノール
90	56	98	61
75	19	86	2
50	23	3	2

## [0030] 実施例11

(唾液吸収体素材の材質の違いによらずエタノールで分析目的成分が抽出されることの確認)

実施例2の検体調製法において唾液の吸収体の素材と75%(V/V)エタノールでの抽出回収率について比較検討を行った。吸収体50mgを唾液600  $\mu$  lに浸漬した後、エタノール1800  $\mu$  lを加えて混合し、4℃、1000Gにて5分間の遠心分離により除タンパク質を行い、上清20  $\mu$  lをHPLCに供した。CoQ10分析結果を表3「吸収体50mgを唾液600  $\mu$  lに浸漬した後、エタノール1800  $\mu$  l(終濃度75%)で抽出したときの唾液中のCoQ10濃度」に示す。濃度75%(V/V)で抽出したときの唾液中のCoQ10濃度は、唾液吸収体の素材によらず、75%(V/V)でほぼ100%回収できることを確認した。これより、唾液中の脂溶性成分が吸収体へ吸着しても、吸収体と隙間に保持された唾液中に含まれる脂溶性フードファクターや脂溶性ビタミンの総和を分析することにより、一定容量の唾液1中の含量を求めることが可能となる。

[表3]

処理条件	CoQ10(ng/ml)	回収率(%)
唾液(コントロール)	33.7	100
コットン+エタノール	32.2	95.6
ポリエステル+エタノール	34.2	102
ポリウレタン+エタノール	32.1	95.2
アセチルセルロース+エタノール	31.8	94.3

## [0031] 実施例12

(不良な過塩素酸塩を用いて調製した移動相への有機酸類添加によるCoQ10標準品溶液のクロマトグラム改善効果)

50ng/mlのCoQ10標準品溶液を150  $\mu$  l注入して得られる良好なクロマトグラム形状の例を図11の(1)に、移動相調製にロット不良な塩素酸ナトリウムを用いたときに得られる形状不良なクロマトグラムを図11の(2)に示した。図11の(1)の形状良好なクロマトグラムは、例えば移動相調製にSigma-Aldrich社製の過塩素酸ナトリウム(ロット番号09704KB)を用いることによって得ることができる。図11の(2)の形状不良なクロマトグラムは、移動相調製に関東化学社製の過塩素酸ナトリウム(ロット番号17129CA)を用いて得たものである。図11の(2)の形状不良のクロマトグラムを発生させる移動相にギ酸ナトリウムを5mM加え、50ng/mlのCoQ10標準品溶液を1



50  $\mu$ l 注入して得られた良好な形状のクロマトグラムが図11の(3)である。同様に、図11の(2)の形状不良のクロマトグラムを発生させる移動相に酢酸ナトリウム、グリシン、クエン酸ナトリウムおよびEDTA(エチエレンジアミン四酢酸)二ナトリウムをそれぞれ5mM加え、50ng/mlのCoQ10標準品溶液を150  $\mu$ l 注入して得られた良好な形状のクロマトグラムが図11の(4)、(5)、(6)および(7)である。有機酸添加による過塩素酸ナトリウムのメーカー及びロット間差によるクロマトグラムの形状不良の改善効果は、移動相2へ添加することにより得られる。より好ましくは移動相1と移動相2の両方へ添加することにより得られる。移動相1および移動相2への有機酸の添加量は、検量線の低濃度側から高濃度側まで問題なく測定可能な、0.1〜10mM、好ましくは3〜7mM、より好ましくは5mMである。EDTAおよびクエン酸は移動相に5mM加えると溶解しきらずに析出するがある場合があるが、このような場合であっても、過塩素酸ナトリウムのメーカー及びロット間差によるクロマトグラムの形状不良の改善効果を得ることができる。

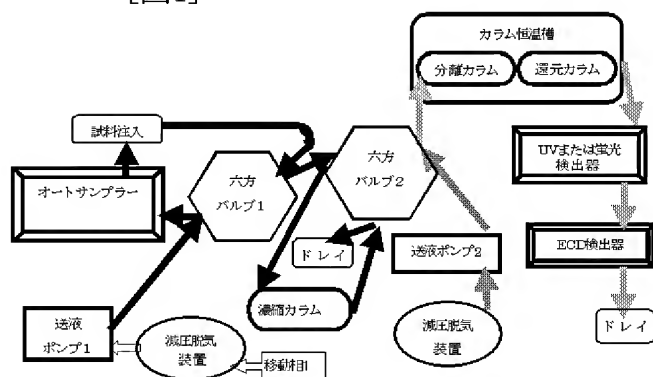
## 請求の範囲

- [1] 唾液中の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを分析することを特徴とする、生体内の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを検査する方法。
- [2] 唾液中の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを分析することを特徴とする、摂取された健康補助食品、薬剤または食物に含まれる脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内移行を検査する方法。
- [3] 検査が、健康補助食品、薬剤もしくは食物を摂取前の被験者の唾液中の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの濃度を基準あるいは健康補助食品、薬剤もしくは食物を摂取していない対照者群の唾液中の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの濃度の平均値を基準として行なわれることを特徴とする、請求項2に記載の方法。
- [4] 唾液中の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを指標として分析することを特徴とする、投与された治療薬剤の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内合成もしくは代謝に対する効果または作用を検査する方法。
- [5] 検査が、治療薬剤を投与前の被験者の唾液中の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの濃度を基準あるいは治療薬剤を投与していない対照者群の唾液中の脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの濃度の平均値を基準とすることを特徴とする、請求項4に記載の方法。
- [6] 請求項2または3に記載の方法を用いる、脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを含む健康補助食品、薬剤もしくは食物の摂取または摂取量の適否を判定する方法。
- [7] 請求項4または5に記載の方法を用いる、脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターの生体内合成もしくは代謝に対する効果または作用を有する治療薬剤の投与または投与量の適否を判定する方法。
- [8] 唾液が、耳下腺唾液である、請求項1〜7のいずれかに記載の方法。
- [9] 耳下腺唾液が、耳下腺唾液を選択的かつ定量的に採取する唾液採取具で採取されたものである、請求項8に記載の方法。
- [10] 唾液採取具が、(a)唾液を不可逆的に吸収する吸収体からなる採取部と、(b)吸収

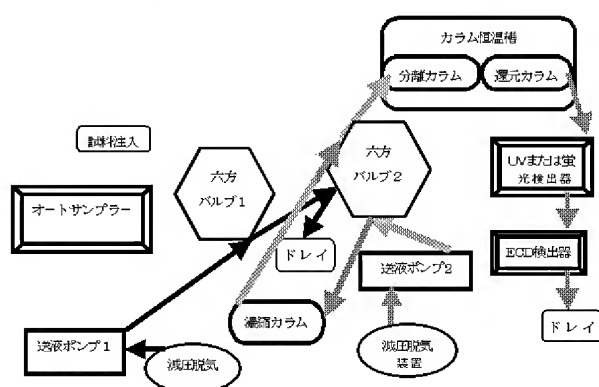
体に採取された唾液の量を定量する定量部、を有することを特徴とする、請求項9に記載の方法。

- [11] 唾液採取具が、さらに唾液の保存料溶液を含み唾液を吸収した吸収体を該溶液に浸漬して保存する保管容器部を有することを特徴とする、請求項10に記載の方法。
- [12] 唾液の保存料溶液が、水溶性の有機溶媒であることを特徴とする、請求項11に記載の方法。
- [13] 検査が、
  - (a)採取された唾液、該唾液を吸収した吸収体及び／又は該吸収体を保存した保存料溶液を、水溶性の有機溶媒、炭化水素系の有機溶媒、またはイソプロパノールと酢酸エチルの混合液、で抽出する工程、
  - (b)抽出液を分析試料とし、高速液体クロマトグラフィーにより脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを分離する工程、
  - (c)分離した脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターを検出する工程、を含むことを特徴とする、請求項1〜12のいずれかに記載の方法。
- [14] 脂溶性ビタミン及び／又は脂溶性フードファクターが、CoQ10、リコペン、 $\beta$ -カロテンおよびトコフェロールからなる群から選ばれる少なくとも一つの物質である、請求項1〜13のいずれかに記載の方法。
- [15] 請求項1〜14のいずれかに記載の方法を使用する薬剤または健康補助食品のスクリーニング方法。

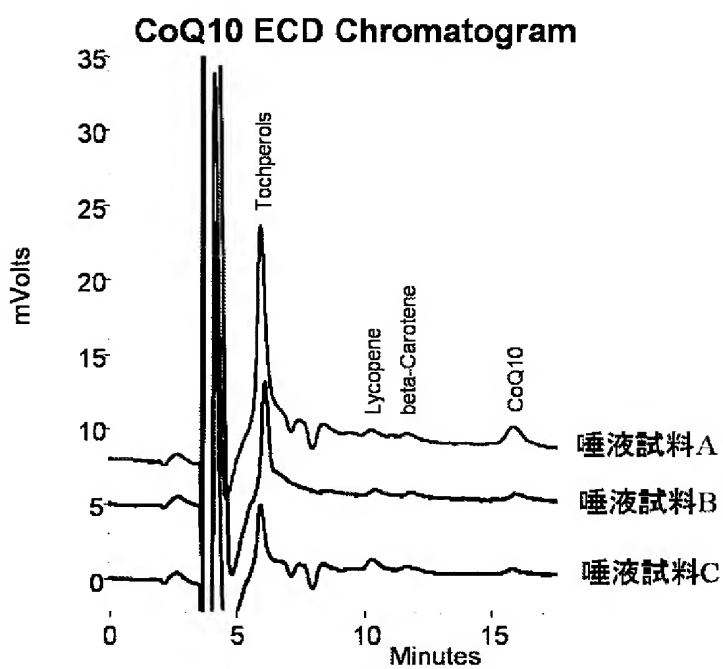
[図1]



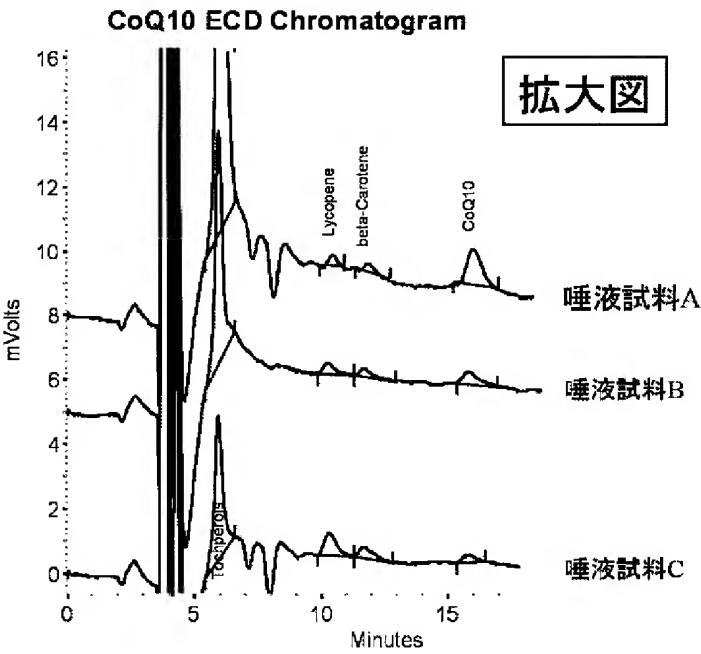
[図2]



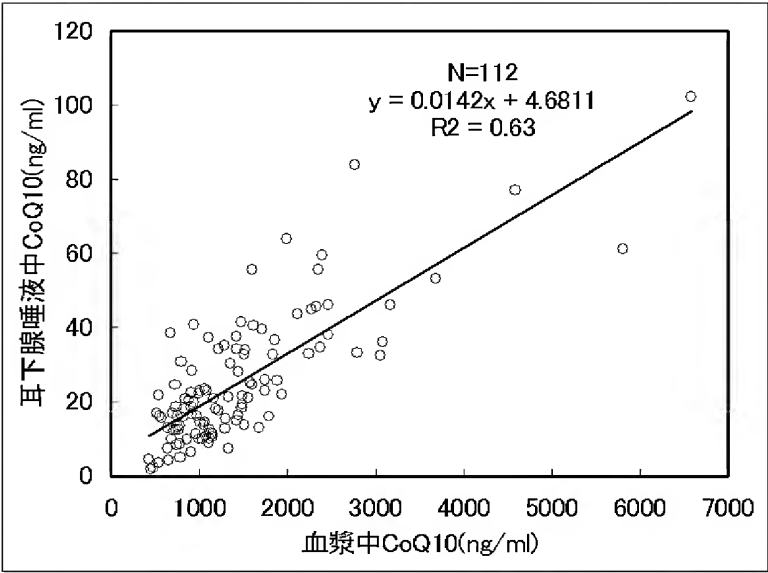
[図3]



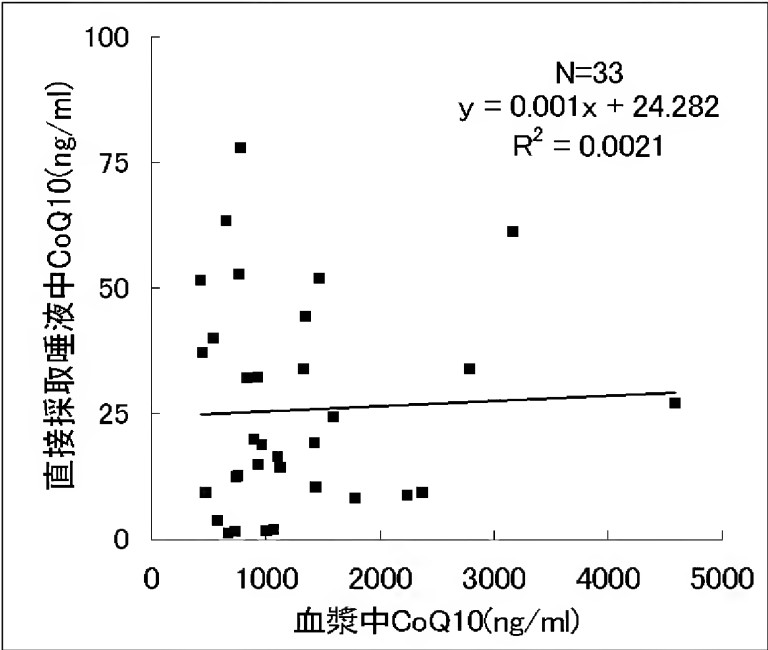
[図4]



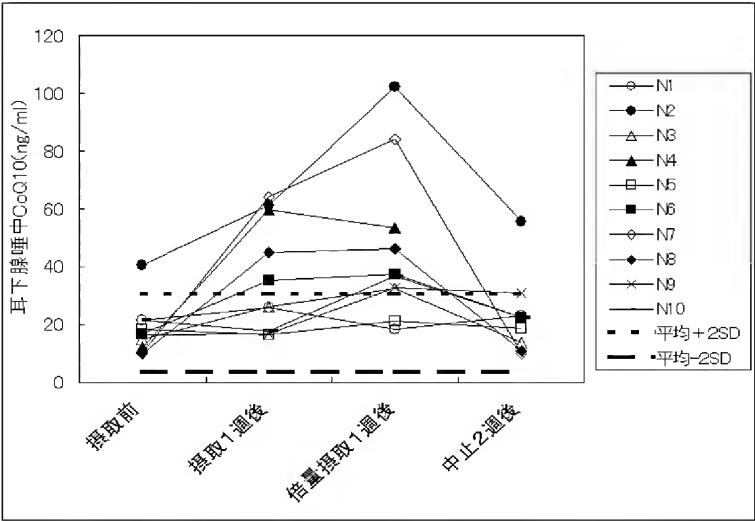
[図5]



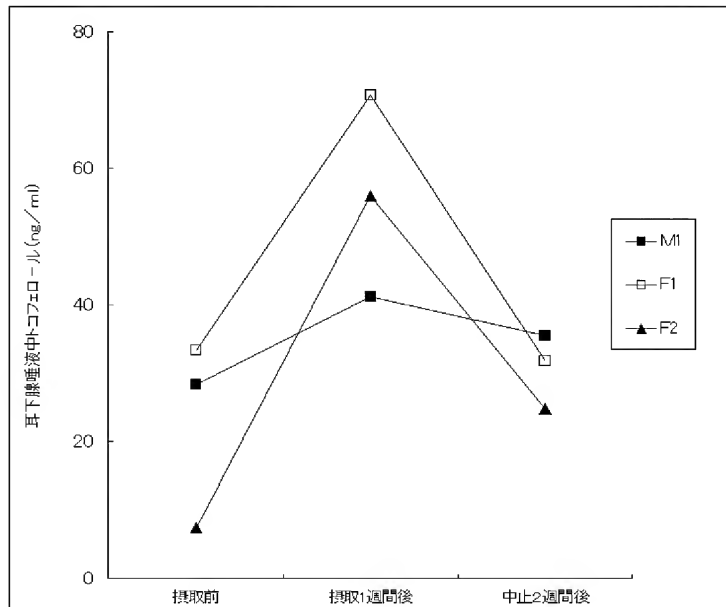
[図6]



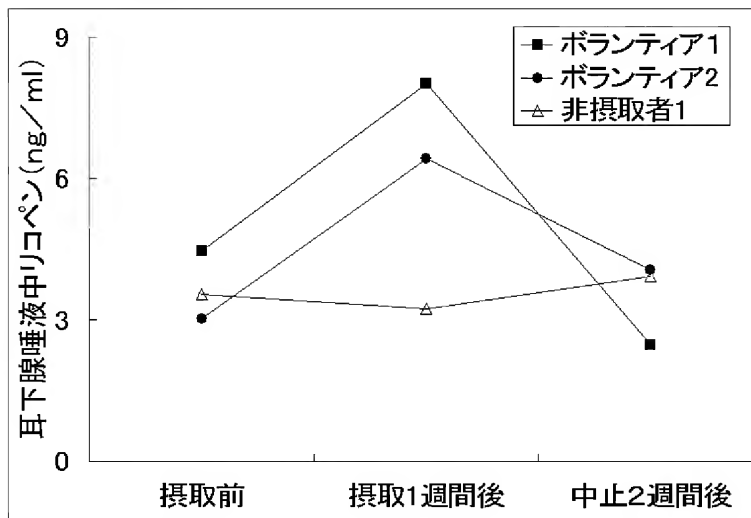
[図7]



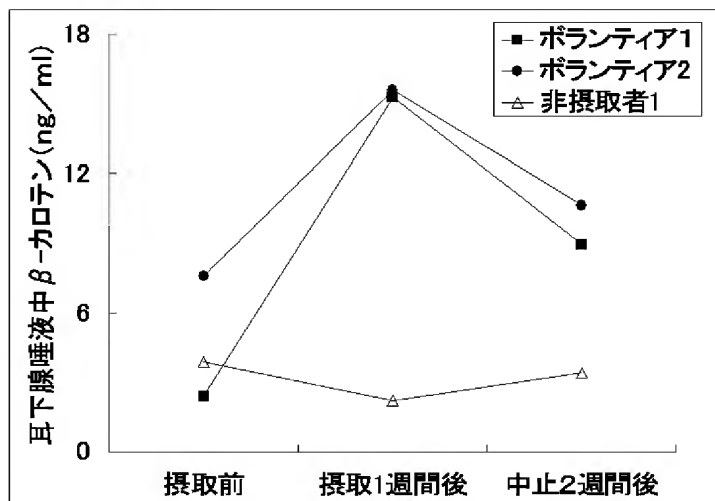
[図8]


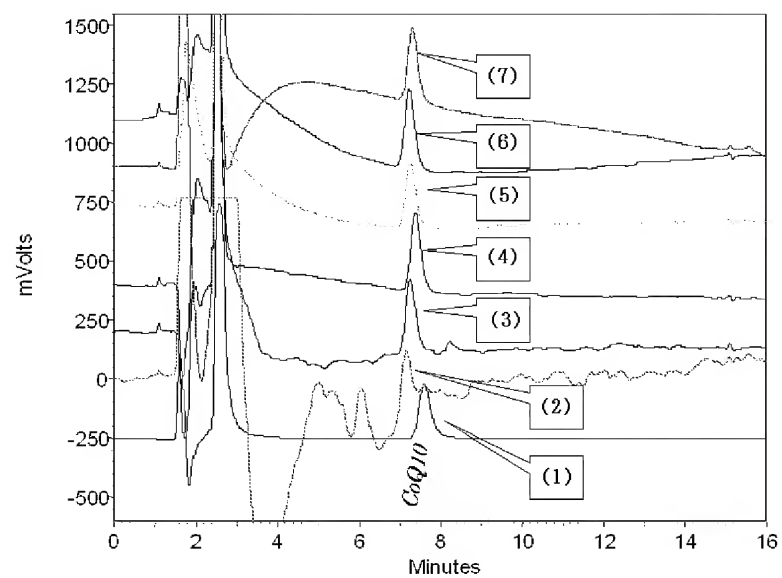


[図9]



[図10]



[[11]]



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003651

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/50, G01N33/82, G01N33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/50, G01N33/82, G01N33/92, G01N33/48, G01N33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST (JOIS), CA (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	LUMIKARI et al., Saliva concentration of some Selected Proteins and Glycoprotein Markers in Man after Supplementary Intake of $\beta$ -Carotene, International Journal of Vitamin and Nutrition Research, 1988, Vol.58, No.2, pages 171 to 177, Summary, page 173, lines 7 to 22	1-3, 6, 13-15 4, 5, 7-12
A	Hideo KATSUGAWA et al., "Daeki Seibun eno Shokumotsu Seibun no Eikyo", Medicine and Biology, 1998, Vol.137, No.6, pages 327 to 330	1-15
A	JP 2000-9727 A (Daikin Industries, Ltd.), 14 January, 2000 (14.01.00), (Family: none)	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 March, 2005 (30.03.05)

Date of mailing of the international search report

12 April, 2005 (12.04.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003651

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2002-168848 A (Tomohiko OGAWA), 14 June, 2002 (14.06.02), (Family: none)	1-15
A	JP 5-203578 A (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), 10 August, 1993 (10.08.93), (Family: none)	1-15

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N33/50, G01N33/82, G01N33/15

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> G01N33/50, G01N33/82, G01N33/92, G01N33/48,  
G01N33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICST (JOIS)、CA (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	LUMIKARI et al, Saliva concentration of some Selected Proteins and Glycoprotein Markers in Man after Supplementary Intake of $\beta$ -Carotene, International Journal of Vitamin and Nutrition Research, 1988, Vol.58, No.2, pages 171-177 Summary、173 ページ7行~22行	1-3、6、13-15
A		4、5、7-12
A	勝川秀夫他, 唾液成分への食物成分の影響, 医学と生物学, 1998, Vol. 137, No. 6, pages 327-330	1-15

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30.03.2005

国際調査報告の発送日

12.4.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村 祥子

2J

3312

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (2004年1月)